

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 7 月 24 日 (24.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/060516 A1

(51) 国際特許分類:  
33/15, C07K 16/18, A61K 45/00, 48/00

G01N 33/50,

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.);  
〒532-0024 大阪府 大阪市 淀川区 十三本町 2 丁目  
1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00111

(22) 国際出願日: 2003 年 1 月 9 日 (09.01.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-003769 2002 年 1 月 10 日 (10.01.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品  
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,  
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修  
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 野田 昌邦  
(NODA, Masakuni) [JP/JP]; 〒665-0861 兵庫県 宝塚  
市 中山寺 3 丁目 8 番 7 号 Hyogo (JP). 松尾 孝徳  
(MATSUO, Takanori) [JP/JP]; 〒563-0026 大阪府 池  
田市 緑丘 1 丁目 3 番 2 1 号 Osaka (JP). 柘植 裕子  
(TSUGE, Hiroko) [JP/JP]; 〒663-8106 兵庫県 西宮市  
大屋町 1 7 番 1 0 - 7 0 8 号 Hyogo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ,  
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,  
ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ  
特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特  
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: スクリーニング方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of screening a substance capable of preventing/treating diseases in which a protein having an amino acid sequence being the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or its salt participates, characterized by using the above protein or its salt.

(57) 要約:

本発明は、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一  
のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とす  
る、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリー  
ニング方法を提供する。

WO 03/060516 A1

## 明 細 書

## スクリーニング方法

## 5 技術分野

本発明は、腎疾患などの予防・治療薬をスクリーニングするための方法に関する。

## 背景技術

- 10 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、Early Growth Response-1 (本明細書中、E g r -1 と略記することがある) が知られている。

- E g r -1 は、虚血により活性化され、炎症、凝固および血管透過性の重要なレギュレーターの発現を誘導する転写因子である (Nature Medicine, vol. 6, 15 No. 12, p. 1355)。

これまでに、E g r -1 を用いて、E g r -1 が関連する疾患の予防・治療薬をスクリーニングする方法についての報告は見当たっていない。

- なお、現在、腎疾患の治療薬としては、アンジオテンシン変換酵素阻害剤などが用いられているが、本薬剤は、腎血行動態に影響を及ぼすために、高度の腎機能低下患者に用いることはできない。

優れた効果を有し、かつ、副作用のない腎疾患などの予防・治療薬、およびこのような予防・治療薬をスクリーニングすることの可能な方法が求められている。

## 25 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、腎疾患モデル動物において腎 E g r -1 の発現が顕著に増加していることを初めて見出し、さらに、腎疾患モデル動物における腎 E g r -1 の発現を抑制することによって、腎疾患の治療効果が得られることを初めて見出した。本発明

者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- 5 1) 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法;
- 2) 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法;
- 10 3) タンパク質が配列番号:2 で表されるアミノ酸配列を有する前記1) 記載のスクリーニング方法;
- 4) 疾患が腎疾患である前記1) 記載のスクリーニング方法;
- 5) 腎疾患がE g r -1 依存性腎疾患である前記4) 記載のスクリーニング方法;
- 15 6) 腎疾患が糖尿病性腎症である前記4) 記載のスクリーニング方法;
- 7) 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の生産量を比較することを特徴とする、前記1) 記載のスクリーニング方法;
- 20 8) 試験化合物の存在下および非存在下において、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の活性を比較することを特徴とする、前記1) 記載のスクリーニング方法;
- 25 9) 活性が、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一

のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が結合し得るポリヌクレオチドに対する結合活性である前記 8) 記載のスクリーニング方法；

- 1 0) 活性が、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩による転写制御の支配  
5 下にある遺伝子の発現制御活性である前記 8) 記載のスクリーニング方法；

- 1 1) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、該細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、該タン  
10 パク質またはその塩の生産量および該タンパク質またはその塩が結合し得るポリヌクレオチドに対する結合活性を、該ポリヌクレオチドおよび該タンパク質またはその塩に対する抗体を用いて測定・比較することを特徴とする、前記 1) 記載のスクリーニング方法；

1 2) 前記 1) 記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩；

- 1 3) 前記 1) 記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩を含有してなる、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬；

- 1 4) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードする塩基配列またはその部分配列を含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリー  
20 ニング方法；

- 1 5) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードする塩基配列またはその部分配列を含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリー  
25 ニング方法；

- 1 6) ポリヌクレオチドが配列番号:3 または配列番号:4 で表される塩基配列またはその部分配列を含有する前記 1 4) 記載のスクリーニング方法;
- 1 7) 疾患が腎疾患である前記 1 4) 記載のスクリーニング方法;
- 1 8) 腎疾患が E g r -1 依存性腎疾患である前記 1 7) 記載のスクリーニ  
5 グ方法;
- 1 9) 腎疾患が糖尿病性腎症である前記 1 7) 記載のスクリーニング方法;
- 2 0) 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に  
10 同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードする RNA の量を比較することを特徴とする、前記 1 4) 記載のスクリーニング方法;
- 15 2 1) 前記 1 4) 記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩;
- 2 2) 前記 1 4) 記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩を含有してなる、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾  
20 患の予防・治療薬;
- 2 3) 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩に対する抗体;
- 2 4) 前記 2 3) 記載の抗体を含有してなる、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬;  
25 2 5) 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその部分配列を有するポリヌクレオチドを含有してなる、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有す

- るタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬；
- 26) 前記23)記載の抗体を含有してなる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の診断薬；
- 5 27) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列またはその部分配列を有するポリヌクレオチドを含有してなる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の診断薬；
- 10 28) 配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬；
- 29) 疾患が腎疾患である前記28)記載の予防・治療薬；
- 15 30) 腎疾患がEg r-1依存性腎疾患である前記29)記載の予防・治療薬；
- 31) 腎疾患が糖尿病性腎症である前記29)記載の予防・治療薬；
- 32) Eg r-1抑制薬を含有してなる糖尿病性腎症の予防・治療薬；
- 33) Eg r-1抑制薬が腎Eg r-1抑制薬である前記32)記載の予防・治療薬；
- 20 34) 哺乳動物にEg r-1抑制薬を投与することを特徴とする、該哺乳動物における糖尿病性腎症の予防または治療方法；
- 35) Eg r-1抑制薬が腎Eg r-1抑制薬である前記34)記載の方法；
- 36) 糖尿病性腎症の予防・治療薬を製造するための、Eg r-1抑制薬の使用；
- 25 37) Eg r-1抑制薬が腎Eg r-1抑制薬である前記36)記載の使用；  
などに関する。

発明を実施するための最良の形態

本発明において、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実

質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と略記することがある）は、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髓、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってよく、合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、特に好ましくは約80%以上、最も好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、線維化関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、および血栓関連遺伝子の転写制御活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）

同質であることを示す。したがって、転写制御活性が同等（例、約 0.01 ～ 100 倍、好ましくは約 0.1 ～ 10 倍、より好ましくは 0.5 ～ 2 倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

- 5 線維化関連遺伝子としては、例えば、platelet-derived growth factor-A chain (PDGF-A chain)、platelet-derived growth factor-B chain (PDGF-B chain)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、tumor growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)、vascular  
10 endothelial cell growth factor (VEGF)、PDGF  $\beta$  receptor (PDGF  $\beta$  R)、insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1 R)、fibronectin、 $\alpha$ 2 (I) collagen などが挙げられる。細胞周期関連遺伝子としては、例えば p53 などが挙げられる。血栓関連遺伝子としては、例えば、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、tissue factor (TF)、metalloproteinase などが挙げ  
15 られる。

転写制御活性の測定は、公知の方法、例えば Shi-Fang Yan らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 巻、8298-8303 頁、1998 年) またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

- また、本発明のタンパク質としては、例えば、①配列番号：1 で表される  
20 アミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ～ 30 個程度、好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数（1 ～ 5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ～ 30 個程度、好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数（1 ～ 5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：  
25 1 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ～ 30 個程度、好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数（1 ～ 5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ～ 30 個程度、好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数（1 ～ 5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換



されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は特に限定されない。

- 5      本発明のタンパク質は、好ましくは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質、すなわちE g r -1である。

- 本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明  
10      のタンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであつてもよい。

- ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基；例えば、フェニル、  
15       $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基； $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

- 20      本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で  
25      切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、

ホルミル基、アセチル基などの $C_{1-6}$ アルカノイル基などの $C_{1-6}$ アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、  
5 有機酸)や塩基(例、アルカリ金属塩)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼン  
10 スルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質またはその塩は、前述した温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することができる。具体的には、温血動物の組織または細胞をホモジナイズし、可溶画分を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー  
15 で分離精製することによって、本発明のタンパク質またはその塩を製造することができる。

本発明のタンパク質またはその塩は、公知のペプチド合成法にしたがって製造することもできる。

ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであっても  
20 よい。本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とするタンパク質を製造することができる。

ここで、縮合や保護基の脱離は、自体公知の方法、例えば、以下の①～⑤に記載された方法にしたがって行われる。

- 25 ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)  
②Schroeder および Luecke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)  
③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、  
(1977 年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、広川書店

5      このようにして得られたタンパク質は、公知の精製法により精製単離する  
ことができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラム  
クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせ  
などが挙げられる。

10      上記方法で得られるタンパク質が遊離体である場合には、該遊離体を公知  
の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができる  
し、逆にタンパク質が塩として得られた場合には、該塩を公知の方法あるい  
はそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

15      本発明のタンパク質またはその塩は、通常、市販のタンパク質合成用樹脂  
を用いて合成される。このような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、  
ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4  
-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミ  
ン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメ  
チル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニ  
ル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフ  
エニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などが挙げられる。

20      このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミ  
ノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従  
い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同  
時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形  
成反応を行って、目的のタンパク質を取得する。

25      上記した保護アミノ酸の縮合においては、タンパク質合成に使用できる各  
種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類が好ましい。  
カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイ  
ミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミド  
などが用いられる。

保護アミノ酸の縮合は、例えば活性化試薬およびラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、あらかじめ保護アミノ酸を対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとして活性化した後に樹脂に添加することによって行われる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒は、タンパク質縮合反応に使用しうるものが知られている溶媒から適宜選択される。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド, N, N-ジメチルアセトアミド, N-メチルピロリドンなどの酸アミド類；塩化メチレン, クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類；トリフルオロエタノールなどのアルコール類；ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類；ピリジンなどのアミン類；ジオキサン, テトラヒドロフランなどのエーテル類；アセトニトリル, プロピオニトリルなどのニトリル類；酢酸メチル, 酢酸エチルなどのエステル類；あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。

反応温度は、タンパク質縮合反応に使用されることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は、通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には、保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。縮合反応を繰り返しても縮合が不十分な場合には、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、十分な縮合を行なうことができる。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護方法ならびに保護基、およびその保護基の脱離方法、反応に関与する官能基の活性化方法などは、公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニル

スルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。

原料アミノ酸のカルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例  
5 えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護する  
10 ことができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。エステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（ $C_{1-6}$ ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジル  
15 オキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などが挙げられる。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メト  
20 キシー-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元；無水フッ化水素、メタン  
25 スルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理；ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理；液体アンモニア中ナトリウムによる還元などが挙げられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれる。酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾー

ル、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基は、チオフェノール処理により除去される。トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は、1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料アミノ酸のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料アミノ酸のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

タンパク質のアミド体は、公知の方法にしたがい、該タンパク質のカルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化することによって製造することができる。

タンパク質のエステル体は、例えば、該タンパク質のカルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合することによって製造することができる。

さらに、本発明のタンパク質またはその塩は、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養し、得られる培養物から本発明のタンパク質またはその塩を分離精製することによって製造することもできる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAなどが挙げられる。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse

Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、R T-P C R法と略称する) によって増幅することもできる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3  
または配列番号：4で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：  
5 3または配列番号：4で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下  
でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：1で表される  
アミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性（例、線維化関連  
遺伝子、細胞周期関連遺伝子、および血栓関連遺伝子の転写制御活性など）  
を有するタンパク質をコードするDNAなどが挙げられる。

10 配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列とハイストリンジェ  
ントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：  
3または配列番号：4で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約6  
0%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、  
特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有す  
15 る塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、  
例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook  
et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って  
行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリ  
20 ダイゼーションは、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことがで  
きる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、ハイストリンジェントな条  
件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～4  
0mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましく  
25 は約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度  
が約65℃の場合が好ましい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列（好ましくは、配列番号：2で表さ  
れるアミノ酸配列）を含有するタンパク質をコードするDNAは、好ましく  
は配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列を含有するDNAな

どである。

本発明のタンパク質を完全にコードするDNAは、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当な発現ベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションすることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km (宝酒造 (株))、Mutan<sup>TM</sup>-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR 法、Gapped duplex 法、Kunkel 法等の自他公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することができる。

前記した発現ベクターは、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13); 枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194); 酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15); λファージなどのバクテリオファージ; レトロウイルス,



ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルス；pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

5 プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば、宿主が動物細胞である場合、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどが好ましい。

10 宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

15 宿主が酵母である場合、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

20 発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、  
25 ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用い、dhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によって選択することもできる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質

- のN端末側に付加してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合、Pho A・シグナル配列、Omp A・シグナル配列などが；宿主がバチルス属菌である場合、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが；宿主が酵母である場合、MF  $\alpha$ ・シグナル配列、SUC 2・シグナル配列などが；
- 5 宿主が動物細胞である場合、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ用いられる。

本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体は、公知の方法にしたがい、該DNAを含有する発現ベクターで、宿主を形質転換することによって製造することができる。

- 10 ここで、発現ベクターとしては、前記したものが挙げられる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

- エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2・DH 1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・
- 15 オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・
- 20 モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

- バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)

NCYC 1913, NCYC 2036, ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが AcNPV の場合、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来の MG1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High Five™ 細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞、*Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが BmNPV の場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該 Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 COS-7, Ver o, チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記), マウス L細胞, マウス AtT-20, マウスミエローマ細胞, ラット GH3, ヒト FL細胞などが用いられる。

形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法にしたがって実施することができる。

エシェリヒア属菌は、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972) や ジーン (Gene), 17巻, 107(1982) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

バチルス属菌は、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

酵母は、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc.

Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

昆虫細胞および昆虫は、例えば、バイオ／テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

- 5 動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995)(秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って形質転換することができる。

形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法にしたがって実施することができる。

- 10 例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム
- 15 塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が；無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5～8である。
- 20 宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。必要により、
- 25 プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約15～43℃で、約3～24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、通常約30～40℃で、

約6～24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が酵母である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5～8である。培養は、通常約20℃～35℃で、約24～72時間行なわれる。必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6.2～6.4である。培養は、通常約27℃で、約3～5日間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6～8である。培養は、通常約30℃～40℃で、約15～60時間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明の

タンパク質を製造することができる。

前記形質転換体を培養して得られる培養物から本発明のタンパク質を自体公知の方法にしたがって分離精製することができる。

例えば、本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出する場合、  
5 培養物から公知の方法で集めた菌体あるいは細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。該緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤を含んでいてもよい。また、核  
10 画分から本発明のタンパク質を抽出する場合は、上記の遠心分離またはろ過により得られる沈殿を例えば高張液等で処理し、遠心分離して上清を回収することにより、核タンパク質の粗抽出液を得る方法などが用いられる。培養物中にタンパク質が分泌される場合には、培養物から、公知の方法で培養上清を集める方法が用いられる。

15 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の方法にしたがって分離精製することができる。このような方法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラ  
20 フィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法；などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。

25 かくして得られるタンパク質が遊離体として得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって、該遊離体を塩に変換することができ、タンパク質が塩として得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、該塩を遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、形質転換体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な

蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。該蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

- 5      かくして得られる本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

本発明のタンパク質が関連する疾患としては、正常時と比較した場合に、本発明のタンパク質の量が増加あるいは減少している疾患が挙げられる。

- 10      ここで、「正常時と比較した場合に、本発明のタンパク質の量が増加している疾患」としては、例えば腎疾患（例えば、糖尿病性腎症；慢性糸球体腎炎；IgA 腎症；腎移植後の慢性拒絶；腎癌；腹膜透析時の腹膜硬化症）；循環器疾患（例えば、動脈硬化症；心筋梗塞；心不全；心筋症；PTCA およびステント留置後の血管再狭窄；心・血管移植後の慢性拒絶；血栓症）；脳血管障害（例えば、脳梗塞）；肺疾患（例えば、肺線維症、慢性閉塞性肺症候群、肺癌）；肝疾患（例えば、肝硬変、肝炎、肝癌）；消化管疾患（例えば、大腸炎、胃癌、大腸癌）；性腺疾患（例えば、前立腺癌）；膠原病（例えば、強皮症、全身性エリテマトーデス）；リウマチ性疾患（例えば、慢性関節リウマチ）；骨疾患（例えば、骨粗鬆症）などが挙げられる。
- 15      「正常時と比較した場合に、本発明のタンパク質の量が減少している疾患」としては、例えば消化管疾患（例えば、胃潰瘍、十二指腸潰瘍）；皮膚疾患（例えば、火傷、術後の創傷）などが挙げられる。

本発明のタンパク質が関連する疾患としては、「正常時と比較した場合に、本発明のタンパク質の量が増加している疾患」が好ましい。

- 20      また、本発明のタンパク質が関連する疾患としては、生体内における E g r - 1 の量に依存して発症する、E g r - 1 依存性疾患が好ましい。

本発明のタンパク質が関連する疾患は、好ましくは腎疾患であり、さらに好ましくは E g r - 1 依存性腎疾患である。とりわけ、腎 E g r - 1 依存性腎疾患が好ましい。

本発明は、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする、該タンパク質が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法に関する。

本発明のスクリーニング方法は、例えば、

- 1) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合とで、本発明のタンパク質の生産量を比較すること；
- 2) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合とで、本発明のタンパク質の活性を比較すること；
- 3) 試験化合物が共存する場合と共存しない場合とで、本発明のタンパク質の活性を比較すること；などによって行われる。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞は、該タンパク質を産生する能力を有する細胞である限り特に限定されないが、酸化ストレスや増殖因子（以下、包括的に「Egr-1発現誘導因子」という場合がある）処理などの各種刺激に応じて本発明のタンパク質（好ましくはEgr-1）の産生が誘導されるものが好ましい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞は、前記した「本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体」であってもよい。本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の好適な例としては、哺乳動物（好ましくは、ヒト、ラット、マウスなど）の腎臓から単離された細胞などが挙げられる。これらの細胞は不死化されたものであってもよい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の培養は、前記した形質転換体と同様にして行われる。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられる。

本発明のタンパク質は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質に対する抗体を用いて、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従って定量することができる。



本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質を認識し得る抗体であれば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の何れであってもよい。また、該抗体は、抗体分子そのものであってもよいし、抗体分子の  $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは  $F a b$  画分であってもよい。また、抗体は

5 標識されていてもよい。

抗体の標識に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$  などが用いられる。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、

10  $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン

15 -アビジン系を用いることもできる。

本発明のタンパク質を定量する際、定量されるタンパク質は、細胞内に含まれるものまたは細胞外に分泌されたもののいずれであってもよく、さらに両者の合計であってもよい。

また、細胞内に含まれる本発明のタンパク質を定量する場合、細胞を適当

20 な固定液あるいは膜透過促進剤処理した後に行うことが好ましい。また、細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波または凍結融解などによって細胞を破壊した後、破碎液中のタンパク質を定量することもできる。必要により、破碎液中のタンパク質を分離精製した後に、タンパク質の定量を行ってもよい。

本発明のスクリーニング方法において用いられる本発明のタンパク質の活

25 性としては、例えば転写制御活性などが挙げられる。具体的には、例えば「本発明のタンパク質が結合し得るポリヌクレオチドに対する結合活性」、「本発明のタンパク質による転写制御の支配下にある遺伝子の発現制御活性」などが挙げられる。

該ポリヌクレオチドとしては、例えば、後述の配列番号：5 または配列番

号：6で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチド（好ましくは、配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチド）が挙げられる。

- 上記結合活性は、公知の方法、例えば Shi-Fang Yan らの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 巻、8298-8303 頁、1998 年）またはそれに準じる方法に従ってゲルシフトアッセイ法（electrophoretic mobility shift assay）を用いて測定することができる。あるいは、上記の本発明のタンパク質が結合し得るポリヌクレオチドを適当な固相（例、マイクロタイタープレートなど）上に固定化し（例えば、ビオチン標識した該ポリヌクレオチドを（ストレプト）アビジンを固定化した固相と接触させる等）、本発明のタンパク質（またはそれを含有する画分）および本発明のタンパク質に対する標識化抗体（あるいは本発明のタンパク質に対する抗体および該抗体に対する標識化二次抗体）を固相に添加して反応させ、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従って該固相に結合した本発明のタンパク質を定量することによっても測定することができる。ここで、本発明のタンパク質が本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養して得られた培養物より提供される場合、該細胞における本発明のタンパク質の生産量も同時に測定することができる。また、細胞は、必要に応じて E g r - 1 発現誘導因子の刺激下で培養することができる。
- 「本発明のタンパク質による転写制御の支配下にある遺伝子」としては、前記「実質的に同質の活性」として例示した線維化関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子および血栓関連遺伝子が挙げられる。

- これらの遺伝子の発現制御活性は、実施例に記載の方法に準じて、該遺伝子をコードする DNA 配列から適当なプライマーを作成し、RT-PCR を行って該遺伝子の転写産物量を測定することにより測定できる。また、上記発現制御活性は、公知の方法、例えば Shi-Fang Yan らの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 巻、8298-8303 頁、1998 年）またはそれに準じる方法に従って、該遺伝子をコードする DNA の塩基配列を含むポリヌクレオチドを標識して作成したプローブを用いたノザンブロッティング法により測定できる。また、上記

発現制御活性は、公知の方法、例えば Shi-Fang Yan らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 巻、8298-8303 頁、1998 年) またはそれに準じる方法に従って、「本発明のタンパク質による転写制御の支配下にある遺伝子」をコードする DNA 上において配列番号：5 または配列番号：6 で表される塩基配列を含む転写調節領域と適当なレポーター遺伝子を連結したベクターを作成し、  
5 該ベクターを適当な細胞に導入して、レポーター遺伝子がコードするタンパク質の発現を確認することによっても測定できる。

上記スクリーニング方法によって、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質、すなわち、本発明のタンパク質の産生を調節（促進または  
10 阻害）させる化合物、あるいは本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害）する化合物をスクリーニングすることができる。

例えば、本発明のタンパク質の量を約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上増大させる試験化合物を、本発明のタンパク質の産生を促進する化合物として；本発明のタンパク質の量を約 20% 以上、  
15 好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上減少させる試験化合物を本発明のタンパク質の産生を阻害する化合物として、それぞれ選択することができる。

例えば、本発明のタンパク質の活性を約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上増大させる試験化合物を、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物として；本発明のタンパク質の活性を約 20%  
20 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上減少させる試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物として、それぞれ選択することができる。

尚、上記スクリーニング方法において、試験化合物の存在下と非存在下に  
25 おける本発明のタンパク質の産生量を比較する代わりに、本発明のタンパク質またはその塩が関連する疾患に罹患している疑いのある動物由来の細胞その他の被検体と正常対照動物由来のそれとにおける本発明のタンパク質の量を定量・比較することによって、被検体中における該タンパク質の量の増加または減少が確認された場合、被検体が本発明のタンパク質が関連する疾患

に罹患しているか、または被検体が該疾患に罹患する可能性が高いと診断することができる。

- さらに、同様に本発明のタンパク質の活性を測定・比較することによって、被検体中における該タンパク質の活性の増大または減少が確認された場合、
- 5 被検体が本発明のタンパク質が関連する疾患に罹患しているか、または被検体が該疾患に罹患する可能性が高いと診断することができる。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質は、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿
- 10 などのいずれであってもよい。これらは塩を形成していてもよく、該塩の具体例としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが挙げられる。

- 本発明のスクリーニング方法により得られる「本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質」（化合物）は、必要により薬理学的に許容し得る担体とともに混合して医薬組成物とした後に、本発明のタンパク質が関連
- 15 する疾患の予防・治療薬として用いることができる。

- ここで、薬理学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸
- 20 化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。

- 賦形剤の好適な例としては、乳糖、白糖、D-マンニトール、D-ソルビトール、デンプン、 $\alpha$ 化デンプン、デキストリン、結晶セルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、アラビアゴム、デキストリン、プルラン、軽質無水ケイ酸、合成ケイ酸アル
- 25 ミニウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどが挙げられる。

滑沢剤の好適な例としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。

結合剤の好適な例としては、 $\alpha$ 化デンプン、ショ糖、ゼラチン、アラビアゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチル

セルロースナトリウム、結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、トレハロース、デキストリン、プルラン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

崩壊剤の好適な例としては、乳糖、白糖、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、軽質無水ケイ酸、低置換度ヒドロキシプロピルセルロースなどが挙げられる。

溶剤の好適な例としては、注射用水、生理的食塩水、リンゲル液、アルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油、綿実油などが挙げられる。

溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどが挙げられる。

懸濁化剤の好適な例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子；ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などが挙げられる。

等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、D-ソルビトール、ブドウ糖などが挙げられる。

緩衝剤の好適な例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

無痛化剤の好適な例としては、ベンジルアルコールなどが挙げられる。

防腐剤の好適な例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタ

ノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

抗酸化剤の好適な例としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸塩などが挙げられる。

- 5      着色剤の好適な例としては、水溶性食用タール色素（例、食用赤色 2 号および 3 号、食用黄色 4 号および 5 号、食用青色 1 号および 2 号などの食用色素、水不溶性レーキ色素（例、前記水溶性食用タール色素のアルミニウム塩など）、天然色素（例、 $\beta$ -カロチン、クロロフィル、ベンガラなど）などが挙げられる。

- 10      甘味剤の好適な例としては、サッカリンナトリウム、グリチルリチン酸二カリウム、アスパルテーム、ステビアなどが挙げられる。

- 15      前記医薬組成物の剤形としては、例えば錠剤、カプセル剤（ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む）、顆粒剤、散剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などの経口剤；および注射剤（例、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤など）、外用剤（例、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤など）、坐剤（例、直腸坐剤、膣坐剤など）、ペレット、点滴剤、徐放性製剤（例、徐放性マイクロカプセルなど）等の非経口剤が挙げられ、これらはそれぞれ経口的あるいは非経口的に安全に投与できる。

- 20      医薬組成物は、製剤技術分野において慣用の方法、例えば日本薬局方に記載の方法等により製造することができる。以下に、製剤の具体的な製造法について詳述する。医薬組成物中の本発明のスクリーニング方法により得られる化合物の含量は、剤形、該化合物の投与量などにより異なるが、例えば約 0.1 ないし 100 重量%である。

- 25      例えば、経口剤は、有効成分に、賦形剤（例、乳糖、白糖、デンプン、D-マンニトールなど）、崩壊剤（例、カルボキシメチルセルロースカルシウムなど）、結合剤（例、 $\alpha$ 化デンプン、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンなど）または滑沢剤（例、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール 6000 など）などを添加して圧縮成形し、次いで必要により、味のマ

スキング、腸溶性あるいは持続性を目的として、コーティング基剤を用いて自体公知の方法でコーティングすることにより製造される。

5     該コーティング基剤としては、例えば糖衣基剤、水溶性フィルムコーティング基剤、腸溶性フィルムコーティング基剤、徐放性フィルムコーティング基剤などが挙げられる。

糖衣基剤としては、白糖が用いられ、さらに、タルク、沈降炭酸カルシウム、ゼラチン、アラビアゴム、プルラン、カルナバロウなどから選ばれる1種または2種以上を併用してもよい。

10     水溶性フィルムコーティング基剤としては、例えばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロースなどのセルロース系高分子；ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、アミノアルキルメタアクリレートコポリマーE〔オイドラギットE（商品名）、ロームファルマ社〕、ポリビニルピロリドンなどの合成高分子；プルランなどの多糖類などが挙げら  
15     れる。

腸溶性フィルムコーティング基剤としては、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース フタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロース アセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、酢酸フタル酸セルロースなどのセルロース系高分子；メタアクリル酸コポリマーL〔オイドラギットL（商品名）、ロームファルマ社〕、メタアクリル酸コポリマーL  
20     D〔オイドラギットL-30D55（商品名）、ロームファルマ社〕、メタアクリル酸コポリマーS〔オイドラギットS（商品名）、ロームファルマ社〕などのアクリル酸系高分子；セラックなどの天然物などが挙げられる。

徐放性フィルムコーティング基剤としては、例えばエチルセルロースなどのセルロース系高分子；アミノアルキルメタアクリレートコポリマーRS〔オイドラギットRS（商品名）、ロームファルマ社〕、アクリル酸エチル・メ  
25     タアクリル酸メチル共重合体懸濁液〔オイドラギットNE（商品名）、ロームファルマ社〕などのアクリル酸系高分子などが挙げられる。

上記したコーティング基剤は、その2種以上を適宜の割合で混合して用い

てもよい。また、コーティングの際に、例えば酸化チタン、三二酸化鉄等のような遮光剤を用いてもよい。

5 注射剤は、有効成分を分散剤（例、ポリソルベート 80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 など、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど）、保存剤（例、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノール、フェノールなど）、等張化剤（例、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、D-ソルビトール、ブドウ糖など）などと共に水性溶剤（例、蒸留水、生理的食塩水、リンゲル液等）あるいは油性溶剤（例、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油などの植物油、プロピレングリコール等）などに溶解、懸濁ある  
10 いは乳化することにより製造される。この際、所望により溶解補助剤（例、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、安定剤（例、ヒト血清アルブミン等）、無痛化剤（例、ベンジルアルコール等）等の添加物を用いてもよい。注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

15 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬の投与量は、対象疾患、  
20 投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、腎疾患に罹患している成人患者（体重 60 kg）においては、一日あたり、有効成分である本発明のスクリーニング方法により得られる化合物として、約 0.1 ないし 100 mg、好ましくは約 1.0 ないし 50 mg、より好ましくは約 1.0 ないし 20 mg である。

25 本発明のタンパク質に対する抗体は、該タンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕



(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質を、温血動物に対して、投与により抗体産生が可能な部位に、それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与する。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントア

5 ジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等の哺乳動物（また、哺乳動物以外でニワトリ等）が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 10 例えば、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより
- 15 行なうことができる。融合操作は、既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。
- 20

- 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は、1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000
- 25 ～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブ

- リドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法；抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法；などによりスクリーニングすることができる。

- モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。モノクローナル抗体の選別は、通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。モノクローナル抗体の選別および育種用培地は、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。このような培地としては、例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

- このようにして得られたモノクローナル抗体は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って分離精製することができる。

#### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体は、自体公知の方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あ

るいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

- 5      温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン  
10      1 に対し、約 0.1 ～ 20、好ましくは約 1 ～ 5 の割合でカプリングさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤、例えばグルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

- 15      縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ～ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ～ 10 回程度行なわれる。

- 20      ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

- 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行  
25      なうことができる。

本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質またはその塩と結合してこれを不活性化（中和）することができるので、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として用いることもできる。

該予防・治療薬は、本発明のタンパク質に対する抗体そのものであっても

よいが、該抗体を薬理学的に許容し得る担体とともに混合して得られる医薬組成物であることが好ましい。ここで、薬理学的に許容される担体としては、前記した「本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質」の場合と同様のものが挙げられる。

- 5      該医薬組成物は、前記した「本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質」の場合と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に  
10   投与することができる。

本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、腎疾患に罹患している成人患者（体重60kg）においては、一日あたり、有効成分である本発明のタンパク質に対する抗体として、約0.1ないし100mg、好ましくは約  
15   1.0ないし50mg、より好ましくは約1.0ないし20mgである。

本発明のタンパク質は、例えば腎疾患（例、糖尿病性腎症）などで発現が増加するため、腎疾患における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。よって、本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質が関連する疾患の診断薬として用いること  
20   もできる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質またはその塩を定量  
25   することを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の診断方法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質またはその塩を

定量することを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の診断方法を提供する。

- 上記 (ii) の定量においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体である場合、他方の抗体が本発明のタンパク質の他の部分、  
5 例えばC端部を認識する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて該タンパク質の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

- 10 本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質またはその塩の定量は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、  
15 イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

- 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[<sup>125</sup>I]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>3</sup>H]、[<sup>14</sup>C]などが用いられ  
20 る。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシ  
25 フェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-（ストレプト）アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不

溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

- 5     サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質またはその塩の量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定  
10   法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

- 上記サンドイッチ法による本発明のタンパク質またはその塩の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、  
15   本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

- 20   本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

- 競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を  
25   定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものをを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、い

5      ずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

10      これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

15      例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods

20      in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol.

25      121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質またはその塩を感度良く定量することができる。

本発明の抗体を用いる上記の定量法において、被検動物の生検サンプル（例、腎細胞など）を被検体とし、該検体中の本発明のタンパク質またはその塩の濃度を定量することによって、該タンパク質の発現過多または減少が検出された場合は、例えば、腎疾患などの本発明のタンパク質またはその塩が関連する疾患に罹患しているか、将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

本発明は、さらに本発明のタンパク質をコードする塩基配列またはその部分配列を含有するポリヌクレオチド（以下、本発明のポリヌクレオチドと略記することがある）を用いることを特徴とする、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法に関する。

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）またはその部分配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAが挙げられ、これらは二本鎖または一本鎖のいずれであってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すなわち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。なお、本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前記したものが挙げられる。

本発明のポリヌクレオチドは遊離体であっても塩であってもよく、またアミド体やエステル体であってもよい。該塩としては、本発明のタンパク質の塩と同様のものが挙げられ、アミド体やエステル体としては、末端リン酸基がアミド化もしくはエステル化されたものが挙げられる。

本発明のポリヌクレオチドを用いるスクリーニング方法は、例えば、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合とで、本発明のタンパク質をコードするRNAの量を比較すること；などによって行われる。

ここで、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞、該細胞の培養



方法、および試験化合物としては、前記した本発明のタンパク質を用いるスクリーニング方法と同様のものが挙げられる。

5 本発明のタンパク質をコードするRNAは、公知の方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法またはそれに準じる方法にしたがって定量することができる。例えば、該RNAは、公知の方法、例えば、プローブとして配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列、あるいはそれらの一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション；プライマーとして配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列の一部を含有する核酸を用いるPCR法またはそれに準じる方法；などにしたがって定量することができる。

15 例えば、本発明のタンパク質をコードするRNA（好ましくはmRNA）の量を約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上増大させる試験化合物を、本発明のタンパク質をコードするRNAの発現を促進する化合物として；本発明のタンパク質をコードするRNA（好ましくはmRNA）の量を約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上減少させる試験化合物を、本発明のタンパク質をコードするRNAの発現を阻害する化合物として選択することができる。

20 本発明のポリヌクレオチドを用いるスクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質は、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などのいずれであってもよい。これらは塩を形成していてもよく、該塩の具体例としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが挙げられる。

25 該スクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質は、必要により薬理学的に許容し得る担体とともに混合して医薬組成物とした後に、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として用いることができる。

ここで、薬理学的に許容される担体としては、本発明のタンパク質を用い

るスクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質の場合と同様のものが挙げられる。

該医薬組成物は、本発明のタンパク質を用いるスクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質の場合と同様  
5 にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

10 本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、腎疾患に罹患している成人患者（体重60kg）においては、一日あたり、有効成分である本発明のスクリーニング方法により得られる化合物として、約0.1ないし100mg、好ましくは約1.0ないし50mg、より好ましくは約1.0ないし2  
15 0mgである。

本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質は、該タンパク質をコードする遺伝子のプロモーター活性を検出することによってスクリーニングすることもできる。

20 本発明のタンパク質をコードするDNAがレポーター遺伝子で置換された細胞あるいは非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のタンパク質をコードする遺伝子のプロモーターの支配下に存在するので、試験化合物での処理あるいはその投与後に、レポーター遺伝子がコードする物質の発現を確認することにより、該プロモーターの活性を検出することができる。

25 また、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の転写調節領域とレポーター遺伝子が連結されてできたベクターを有する細胞および非ヒト哺乳動物においても該プロモーターの活性を検出できる。

ここで、レポーター遺伝子としては、例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などが挙げられる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。したがって、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド(X-gal)のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いる染色により、簡便に本発明のタンパク質の発現状態を確認することができる。具体的には、細胞あるいは組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分

5 ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察することにより、細胞あるいは組織における本発明のタンパク質の発現状態を確認することができる。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

15 本発明のタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター活性を促進または阻害する化合物は、該タンパク質の発現、および該タンパク質の活性を調節するため、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として有用である。

本発明のタンパク質をコードするDNAのアンチセンスヌクレオチドは、

20 本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズして該タンパク質への翻訳を阻害するので、本発明のスクリーニング方法により得られる化合物と同様に、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として有用である。

ここで、アンチセンスヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質をコードするDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列、あるいはその部分配列を有し、該DNAの発現抑制作用を有するものであればよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

25

本発明のタンパク質をコードするDNAの塩基配列に実質的に相補的な塩基配列としては、例えば、該DNAの塩基配列に相補的な塩基配列（すなわ

ち、本発明のタンパク質をコードするDNAの相補鎖)の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のタンパク質をコードするDNAの相補鎖の全塩基配列うち、該タンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列(例えば、開始コドン付近の塩基配列など)の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスヌクレオチドが好ましい。

具体的には、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド；好ましくは、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド；などが挙げられる。

アンチセンスヌクレオチドの構成塩基数は本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズして該タンパク質への翻訳を阻害し得る限り特に制限はないが、通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度である。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスヌクレオチドを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基(ホスフェート)は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖(デオキシリボース)は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分(ピリミジン、プリン)も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明のタンパク質をコードするDNAのアンチセンスヌクレオチドは、

低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNAの機能（例、チロキシン脱5'-ヨード化酵素活性）を抑制することができるので、例えば、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として使用することができる。該アンチセンスヌクレオチドは、本発明のタンパク質を用いるスクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質の場合と同様にして、製剤化し、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。また、アンチセンスヌクレオチドは、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後に投与することもできる。

アンチセンスヌクレオチドは、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与してもよく、エアロゾル化後、吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

該アンチセンスヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、腎疾患に罹患している成人患者（体重60 kg）においては、一日あたり、約0.1ないし100 mg、好ましくは約1.0ないし50 mg、より好ましくは約1.0ないし20 mgである。

さらに、本発明のタンパク質をコードするDNAのアンチセンスヌクレオチドは、組織や細胞における該DNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNAの機能を抑制することができるので、例えば、腎疾患の予防・治療剤などとして使用することができる。

ここで、二重鎖RNAは、公知の方法、例えばNature, 411巻, 494頁, 2001年に記載の方法に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して

製造することができる。

リボザイムは、公知の方法、例えば TRENDS in Molecular Medicine, 7 巻, 221 頁, 2001 年に記載の方法に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコード  
5 する RNA の一部に公知のリボザイムを連結することによって、所望のリボザイムを製造することができる。本発明のタンパク質をコードする RNA の一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明の RNA 上の切断部位に近接した部分 (RNA 断片) が挙げられる。

上記の二重鎖 RNA またはリボザイムを本発明のタンパク質が関連する疾  
10 患の予防・治療薬として使用する場合、前記したアンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

本発明のポリヌクレオチドは、例えば、プローブとして使用することにより、哺乳動物 (例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど) における本  
15 発明のタンパク質をコードする DNA または mRNA の異常 (遺伝子異常) を検出することができるので、例えば、該 DNA または mRNA の損傷、突然変異あるいは発現低下や、該 DNA または mRNA の増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のポリヌクレオチドを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公  
20 知のノーザンハイブリダイゼーションや PCR-SSCP 法 (ゲノミックス (Genomics), 第 5 巻, 874~879 頁 (1989 年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユナイテッド・ステーツ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 第 86 巻, 2766~2770 頁 (1989 年)) など  
25 により実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多または減少が検出された場合や PCR-SSCP 法により DNA の突然変異が検出された場合は、例えば、腎疾患などの本発明のタンパク質が関連する疾患に罹患しているか、将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

本発明は、さらに、配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬に関する。ここで、配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質が結合するDNAに対するデコイヌクレオチドである。

該ポリヌクレオチドは、自体公知の方法にしたがって製造することができる。

該ポリヌクレオチドは、低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNAの機能（例、線維化関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、および血栓関連遺伝子の転写制御活性）を抑制することができるので、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として使用することができる。配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質を用いるスクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質の場合と同様にして、製剤化し、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

また、該ポリヌクレオチドは、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後に投与することもできる。

該ポリヌクレオチドは、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与してもよく、エアロゾル化後、吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、腎疾患に罹患している成人患者（体重60kg）においては、一日あたり、有効成分である配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドとして、約0.1ないし100mg、好ましくは約1.0ないし50mg、より好ましくは約1.0ないし20mgである。

本発明は、さらに、E g r -1 抑制薬を含有してなる糖尿病性腎症の予防・治療薬に関する。

5 E g r -1 抑制薬としては、生体内において、E g r -1 の産生もしくは発現；またはE g r -1 の活性を抑制しうる物質であれば、特に限定されず、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などのいずれであってもよい。これらは塩を形成していてもよく、該塩の具体例としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが挙げられる。

10 E g r -1 抑制薬は、好ましくは、腎臓において、E g r -1 の産生もしくは発現；またはE g r -1 の活性を抑制しうる物質、すなわち、腎E g r -1 抑制薬である。

E g r -1 抑制薬は、生体内において、線維化関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、血栓関連遺伝子などの因子の産生もしくは発現；またはこれらの因子の活性を抑制しうる物質であってもよい。

15 ここで、線維化関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子および血栓関連遺伝子としては、前記「実質的に同質の活性」として例示したものが挙げられる。

糖尿病性腎症の予防・治療薬は、E g r -1 抑制薬を用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質の場合と同様にして製剤化することができる。

20 本発明の糖尿病性腎症の予防・治療薬は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

25 本発明の糖尿病性腎症の予防・治療薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、成人患者（体重60kg）においては、一日あたり、有効成分であるE g r -1 抑制薬として、約0.1ないし100mg、好ましくは約1.0ないし50mg、より好ましくは約1.0ないし20mgである。

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPA



C - I U B Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

5	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
10	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
15	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
20	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
25	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸

	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
5	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
10	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	S e c	: セレノシステイン (selenocysteine)

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

- 15 ヒト、マウスおよびラット間で保存されている E g r - 1 のアミノ酸配列の部分配列を示す。

〔配列番号：2〕

ヒト E g r - 1 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

- 20 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有するヒト E g r - 1 をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有するヒト E g r - 1 をコードする DNA の塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：5〕

E g r - 1 のデコイヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

E g r - 1 のデコイヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

Egr-1 アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

Egr-1 cDNAを増幅するためのプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

- 5 Egr-1 cDNAを増幅するためのプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

Egr-1 に結合し得る二本鎖DNAのセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

Egr-1 に結合し得ない二本鎖DNAのセンス鎖の塩基配列を示す。

- 10 以下において、実施例および実験例により本発明をより具体的に示すが、  
本発明はこれらに限定されるものではない。

## 実施例

### 実験例 1

- 15 Wistar fatty ラットの腎臓における early growth response-1 (Egr-1) mRNA  
発現の増加

- 13、22 及び 40 週齢の、インスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) を呈し糖尿病性  
腎症 (DN) を自然発症する雄性 Wistar fatty ラット (武田ラビックス) と、そ  
の正常対照ラットである同週齢の雄性 Wistar lean ラット (武田ラビックス)  
20 を用いて、24 時間蓄尿及び尾静脈採血を行い、尿中アルブミン排泄量、血漿  
中グルコース濃度及び血漿中インスリン濃度を測定した。尿中アルブミン排  
泄量は A/G B テストワコー (和光純薬) を用いて測定し、血漿中グルコース濃  
度は、シンクロン CX5 デルタ (Beckman Coulter) を用いて測定した。インスリ  
ン濃度は、RIA 法 (塩野義製薬) により測定した。

- 25 各 5 匹のラットより腎臓を採取して -80℃ で保存後、腎臓を破碎して total  
RNA を抽出した。既報の mRNA 配列をもとにプライマー及び蛍光プローブを作  
製し、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム定量 RT-PCR  
法により各種 mRNA 発現量を測定した。

結果を [表 1] 及び [表 2] に示す。Wistar fatty ラットは、13 週齢より

NIDDM を呈し、22 週齢より DN を発症して尿中アルブミン排泄量が増加した。22 週齢以降に Egr-1 mRNA 発現量の増加が認められ、40 週齢で Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 及び fibronectin mRNA 発現量の増加が認められた。

5

〔表1〕 尿中アルブミン排泄量、血漿中グルコース濃度及び血漿中インスリン濃度

	Wistar lean ラット			Wistar fatty ラット		
	13週齢	22週齢	40週齢	13週齢	22週齢	40週齢
10						
尿中アルブミン	5.1	4.0	10.4	6.7	55.7	182.0
排泄量 (mg/day)						
血漿中グルコース	138.9	137.1	134.3	319.2	402.9	319.4
濃度 (mg/dl)						
15						
血漿中インスリン	123.0	125.6	158.7	1091.9	1019.2	1674.4
濃度 (μ Units/ml)						
	(n=5, Mean)					

[表2] Wistar fattyラットの腎臓におけるEgr-1、TGF- $\beta$ 1及びfibronectinのmRNA発現量（各週齢のWistar lean ラットの腎臓における発現量を1とした時の相対値）

5	週齢	13週齢	22週齢	40週齢
	Egr-1	1.1	2.2	2.4
	TGF- $\beta$ 1	1.1	1.0	1.7
	Fibronectin	1.2	1.0	2.1

(n=5, Mean)

10

## 実験例 2

Zucker fatty ラットの腎臓における early growth response-1 (Egr-1) mRNA 発現の変化

15 高インスリン血症を呈し、腎障害を自然発症する雄性 Zucker fatty ラット (ZF ラット、18 週齢、日本チャールズリバー) に、0.5%メチルセルロース 100cP に懸濁したカンデサルタン シレキセチル (angiotensin II type1 受容体拮抗薬) を 9 週間、一日一回連日経口投与した。対照群及び正常対照群である同週齢の雄性 Zucker lean ラット (ZL ラット、日本チャールズリバー) には 0.5%メチルセルロース 100cP (Vehicle) を一日一回連日経口投与した。投与  
20 8 週後に 24 時間蓄尿を行い、A/G B テストワコー (和光純薬) を用いて尿中アルブミン排泄量を測定した。投与 9 週後に腎臓を採取し、-80℃で保存後、腎臓を破碎して total RNA を抽出した。既報の mRNA 配列をもとにプライマー及び蛍光プローブを作製し、ABI PRISM7700 (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム定量 RT-PCR 法により各種 mRNA 発現量を測定した。

25 結果を [表 3] 及び [表 4] に示す。尿中アルブミン排泄量が増加している Zucker fatty ラットの腎臓においては Egr-1 mRNA 発現量が増加し、Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、platelet-derived growth factor-B (PDGF-B)、fibronectin 及び  $\alpha$ 1(I) collagen の各 mRNA 発現の増加も認められた。さらに、カンデサルタン シレキセチル投与により尿中ア

ルブミン排泄量の増加が抑制された場合には、上記のいずれの mRNA 発現量増加も抑制された。

[表3] 尿中アルブミン排泄量、血中グルコース濃度及び血中インスリン濃度

5

	ZLラット	ZFラット	ZFラット
	Vehicle	Vehicle	カンデサルタン シレキセチル
尿中アルブミン	48.5	401.5	61.7
排泄量 (mg/day)			

10 (n=8-9, Mean)

[表4] Zucker fattyラットの腎臓におけるEgr-1、TGF- $\beta$ 1、PDGF-B、  
fibronectin及び $\alpha$ 1(I) collagenのmRNA発現量 (ZLラットの腎臓における発現量を1とした時の相対値)

15

	ZFラット	ZFラット
	Vehicle	カンデサルタン
Egr-1	2.9	1.3
TGF- $\beta$ 1	2.1	1.2
20 PDGF-B	1.5	1.0
Fibronectin	2.1	1.1
$\alpha$ 1(I) collagen	2.3	1.6

(n=8-9, Mean)

## 25 実験例 3

ラット腎系球体メサンギウム細胞における early growth response-1 (Egr-1) mRNA 発現の増加

4週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット (SD ラット、日本クレア) より単離培養した腎系球体メサンギウム細胞 (passage 7) を、20% ウシ胎児血清 (FCS) を

含む DMEM 培地で 4 日間培養後、0.2% ウシ血清アルブミンを含む DMEM にて 3 日間培養した。

培養後の細胞に、FCS (20 %) または angiotensin II (AII) ( $10^{-6}$  M) を添加し、37°C で 30 分間反応させた。AII type 1 受容体拮抗薬 カンデサルタンは、FCS または AII 刺激 5 分前に最終濃度が  $10^{-5}$  M になるよう培地に添加した。FCS または AII 刺激 30 分後、total RNA を抽出した。既報の mRNA 配列をもとにプライマーと蛍光プローブを作製し、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム定量 RT-PCR 法により Egr-1 mRNA 発現量を測定した。

結果を [表 5] 及び [表 6] に示す。Egr-1 mRNA 発現量は FCS 刺激 30 分後に著明に増加し、カンデサルタンにより部分的に抑制された。また、AII 刺激 30 分後には Egr-1 mRNA 発現量の軽度の増加が認められ、カンデサルタンにより大部分が抑制された。

[表 5] FCS 刺激による Egr-1 mRNA 発現の増加及びカンデサルタンの抑制作用 (刺激前の発現量を 1 とした時の相対値)

Egr-1 mRNA 発現量	
刺激前	1.0
FCS 刺激 30 分後	26.6
+ Vehicle	
FCS 刺激 30 分後	18.4
+ カンデサルタン	
(n=3, Mean)	

[表 6] AII 刺激による Egr-1 mRNA 発現の増加及びカンデサルタンの抑制作用 (刺激前の発現量を 1 とした時の相対値)

Egr-1mRNA発現量	
5	刺激前 1.0
	AII刺激30分後 2.8
	+ Vehicle
	AII刺激30分後 1.3
	+ カンデサルタン
10	(n=3, Mean)

#### 実験例 4

自然発症高コレステロール血症ラットの腎臓における early growth response-1 (Egr-1) mRNA 発現の増加

- 15 腎障害を自然発症する雄性の自然発症高コレステロール血症ラット (SHC ラット、11 週齢、武田ラビックス) 及び正常対照群である同週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット (SD ラット、日本クレア) を用いて、24 時間蓄尿及び尾静脈採血を行い、尿中アルブミン排泄量及び血漿中総コレステロール濃度を測定した。尿中アルブミン排泄量は A/G B テストワコー (和光純薬) を用いて測定し、血漿中総コレステロール濃度はシンクロン CX5 デルタ (Beckman Coulter) を用いて測定した。

- 25 12 週齢の時点でラットから腎臓を採取し、-80℃で保存後、腎臓を破碎して total RNA を抽出した。既報の mRNA 配列をもとにプライマー及び蛍光プローブを作製し、ABI PRISM7700 (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム定量 RT-PCR 法により Egr-1 mRNA 発現量を測定した。

12 週齢の SHC ラット及び SD ラットの尿中アルブミン排泄量はそれぞれ 179.2 及び 9.2 (mg/day, Mean (n=5)) であり、血漿中コレステロール濃度はそれぞれ 92.4 及び 43.5 (mg/dl, Mean (n=5)) であり、いずれのパラメータも SHC ラットにおいて高値であった。この時の SHC ラットの腎臓における



Egr-1 mRNA 発現量は、SD ラットの腎臓における発現量と比較して、3.8 倍 (Mean (n=5)) に増加していた。

#### 実験例 5

- 5 ヒト胎児腎由来 HEK-293細胞におけるearly growth response (Egr)-1過剰発現による腎線維化関連遺伝子の発現誘導

ヒト胎児腎由来 HEK-293細胞 (CRL-1573、ATCC、passage 40) を、10% ウシ胎児血清を含むDMEM培地で1日培養後、Polyfect (QIAGEN) 20  $\mu$ l/3.5 cm dish を用いてヒトEgr-1発現プラスミドを 2  $\mu$ g/dishの濃度で細胞に導入した。

- 10 なお、Egr-1発現プラスミドはpBK-CMVベクター (STRATAGENE) にヒトEgr-1のコーディング領域のcDNAを組み込んだプラスミドを用いた。コントロールの細胞にはEgr-1プラスミド作製に使用したpBK-CMVベクターのみを導入した。導入24時間後に細胞を回収してタンパク質及びtotal RNAを抽出した。Egr-1タンパク質の発現は、SDS-PAGEを行った後、Egr-1特異的抗体 (Anti-Egr-1 (C-19),  
15 SantaCruz) を用いてWestern blottingを行い、化学発光法 (PIERCE) によりバンドを検出した。検出したバンドの輝度積算値をCS Analyzer 1.00a (ATTO) により算出した。また、腎線維化関連遺伝子のmRNA発現量は、既報のmRNA配列をもとにプライマーと蛍光プローブを作製し、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) を用いて定量的RT-PCR法により測定した。

- 20 結果を [表7] に示す。Egr-1発現プラスミド導入により、Egr-1 タンパク質発現が増加し、また、tissue factor、fibronectin、intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 mRNA の腎線維化関連遺伝子の発現が増加した。

[表7] Egr-1プラスミド導入によるEgr-1 蛋白の発現増加及び、腎線維化関連遺伝子の発現増加（コントロールの発現量を1とした時の相対値）

ヒトEgr-1発現プラスミド 導入細胞	
Egr-1 タンパク質	1.5
Tissue factor mRNA	1.6
Fibronectin mRNA	1.3
ICAM-1 mRNA	4.9
(n=3-6, Mean)	

#### 実施例 1

ラット腎系球体メサンギウム細胞におけるearly growth response-1 (Egr-1) antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) の作用の検討

- 4週齢の雄性SDラットより単離培養した腎系球体メサンギウム細胞 (passege 4-5) を、20% ウシ胎児血清を含むDMEM培地でサブコンフルエントになるまで3-4日間培養後、0.2% ウシ血清アルブミンを含むDMEMに交換して serum starvationを行った。Serum starvation 開始48時間後に Egr-1 AS-ODN (配列番号：7) またはControl-ODN (AS-ODNとサイズおよび各塩基数をマッチさせたscrambled ODN, いずれもBIOGNOSTIK社に合成依頼) を20  $\mu$ Mの濃度で培地中に添加し24時間 CO<sub>2</sub>インキュベーター中で静置後、basic fibroblast growth factor (bFGF) (3 ng/ml) で刺激し、37℃で1-2時間反応した。bFGF刺激1時間後の細胞よりタンパク質を抽出し、bFGF刺激2時間後の細胞よりtotal RNAを抽出した。Egr-1タンパク質の発現は、SDS-PAGEを行った後、Egr-1特異的抗体 (Anti-Egr-1 (C-19), SantaCruz) を用いてWestern blottingを行い、化学発光法 (PIERCE) によりバンドを検出した。検出したバンドの輝度積算値をCS Analyzer 1.00a (ATTO) により算出した。また、tissue factorの mRNA 発現量は、既報のmRNA配列をもとにプライマーと蛍光プローブを作製し、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) を用いて定量的RT-PCR法により測定した。

結果を〔表8〕に示す。bFGF刺激1時間後にEgr-1タンパク質発現は5.1倍に増加し、この増加はEgr-1 AS-ODN 処置により抑制された。Control-ODN処置では抑制作用は全く認められなかった。また、bFGF刺激2時間にtissue factor mRNAが2.5倍に増加したが、この増加は、Egr-1 AS-ODN処置によりほぼ完全に抑制された。Control-ODN処置群では抑制作用は認められなかった。なお、Egr-1 AS-ODNの導入による細胞傷害性は認められなかった。

〔表8〕 Egr-1 AS-ODN導入による、bFGF刺激後のEgr-1 タンパク質の発現及びtissue factor mRNAの発現に対する作用（コントロールの発現量を1とした時の相対値）

刺激 処置	Control	bFGF (3 ng/ml)		
	vehicle	vehicle	AS-ODN	Control-ODN
Egr-1 タンパク質	1.0	5.1	2.0	7.0
Tissue factor mRNA	1.0	2.5	1.1	4.6

(n=2-3, Mean)

## 実施例2 DNA結合活性を利用したEgr-1タンパク質の定量

Egr-1結合配列をもつ合成DNAと抗Egr-1抗体を組み合わせて、マイクロプレートでEgr-1タンパク質量を定量する系を設定した。

### (1) Egr-1発現用プラスミドの構築と動物細胞での発現

ヒトEgr-1 cDNAを得るため、ヒト脂肪組織由来のcDNA (Clontech社) を鋳型とし、合成DNA (配列番号8 および9) をプライマーとして用いたpolymerase chain reactionを行なった。増幅されたcDNAの末端部分を制限酵素EcoRIとPstIで切断し、EcoRIとPstIで切断したプラスミドpcDNA3.1(+) (Invitrogen社) にクローニングし、塩基配列を確認した。

培養シャーレ (FALCON社3003) に、10% FCSと100  $\mu$ g/mlのカナマイシンを含むDMEMを培地として、ヒト由来培養細胞HEK293を $2 \times 10^6$ 個ずつ播き、翌日、上記のEgr-1発現用プラスミド20  $\mu$ gとLipofectamine2000 (Invitrogen社) を

用いて細胞に遺伝子を導入した。48時間後に培地を除き、PBSで洗った後、0.5mlの溶解液〔25mM Tris-HCl (pH7.4)、0.4M NaCl、100  $\mu$ M EDTA、1mM DTT、1% TritonX-100を含む水溶液に1/100量のProtease inhibitor cocktail (SIGMA社、P8340)を加えたもの〕を加えて細胞を溶解させ、サンプルチューブに回収した。氷上で5分間静置した後、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌し、12000xg、4℃で5分間遠心して上清を得た。これを標準サンプルとして用いた。同様に、ベクターであるpcDNA3.1(+)の遺伝子導入も行ない、得られた細胞溶解液を対照として用いた。

## (2) Egr-1の検出

- 10     5' 末端をビオチン標識した、Egr-1結合配列を含む合成DNA (配列番号 1 0) を、その相補鎖の合成DNAと二重鎖を形成させた (相補鎖はビオチン化されていない)。また、Egr-1が結合できなくなる塩基置換を導入した合成DNA (配列番号 1 1) についても二重鎖を形成させ、対照として用いた。これらを、PBSで4倍に希釈したBlock Ace (1mM EDTAを含む) (雪印乳業製、大日本製
- 15     薬より購入) で終濃度50nMに希釈し、100  $\mu$ lずつ、ストレプトアビジンが固相化された96穴プレート (IWAKI) に加えた。室温で30分静置した後、溶液を吸引除去し、PBSで4倍に希釈したBlock Ace (1mM EDTAを含む) を300  $\mu$ lずつ加えて室温で3時間静置した。溶液を除去し、300  $\mu$ lのPBSで3回洗浄し、測定用緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.4)、100mM NaCl、10% Block Ace、200  $\mu$ M
- 20     ZnSO<sub>4</sub>, 250  $\mu$ M DTT、10  $\mu$ g/ml poly dI-dC (Amersham社)、0.05% TritonX-100) で50倍に希釈した標準サンプルあるいは対照サンプル (上記(1)で調製) を100  $\mu$ lずつ各穴に加えた。室温で40分間静置した後、300  $\mu$ lの洗浄液 (2mM imidazole-buffered saline、0.02% Tween 20、200  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>) で3回洗い、poly dI-dCを含まない測定用緩衝液で500倍に希釈した抗Egr-1抗体 (ウサギ、
- 25     ポリクローナル抗体、SANTA CRUZ社、sc-189) を各穴に100  $\mu$ lずつ添加して、4℃で5時間静置した。300  $\mu$ lの洗浄液で3回洗い、poly dI-dCを含まない測定用緩衝液で2000倍に希釈した抗rabbit IgG抗体 (HRP標識、Cell Signaling社) を各穴に100  $\mu$ lずつ添加して、4℃で一晩静置した。300  $\mu$ lの洗浄液で6回洗い、TMB溶液 (DAKO社) を100  $\mu$ lずつ加えて発色させた後、2規定の硫酸

を100  $\mu$ l加えて反応を停止させ、吸光度計（TECAN社、スペクトラレイシボ）を用いて450nmでの吸光度を測定した。

- 5 Egr-1が結合できる配列の合成DNAを固定したプレートで、Egr-1 cDNAを導入した細胞の溶解液を用いた場合の吸光度は0.751であった。同じサンプルを非結合配列のDNAを固定したプレートで測定した場合の吸光度は0.016、DNAを固定していないプレートでは0.005であった。Egr-1 cDNAを導入していない細胞の溶解液を用いて、結合配列のDNAを固定したプレートで測定を行った場合の値は0.005であった。

#### 10 産業上の利用可能性

本発明のスクリーニング法によれば、優れた効果を有し、かつ、副作用のない腎疾患などの予防・治療薬をスクリーニングすることができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法。  
5
2. 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法。
- 10 3. タンパク質が配列番号:2 で表されるアミノ酸配列を有する請求項1記載のスクリーニング方法。
4. 疾患が腎疾患である請求項1記載のスクリーニング方法。
5. 腎疾患がE g r -1 依存性腎疾患である請求項4記載のスクリーニング方法。
- 15 6. 腎疾患が糖尿病性腎症である請求項4記載のスクリーニング方法。
7. 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の生産量を比較することを特徴とする、請求項1記載のスクリーニング方法。  
20
8. 試験化合物の存在下および非存在下において、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の活性を比較することを特徴とする、請求項1記載のスクリーニング方法。  
25
9. 活性が、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が結合し得るポリヌクレ

オチドに対する結合活性である請求項 8 記載のスクリーニング方法。

10. 活性が、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩による転写制御の支配下にある遺伝子の発現制御活性である請求項 8 記載のスクリーニング方法。

- 5 11. 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、該細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、該タンパク質またはその塩の生産量および該タンパク質またはその塩が結合し得るポリヌクレオチドに対する結合活性を、該ポリヌクレオチドおよび該タンパク質またはその塩に対する抗体を用いて測定・比較することを特徴とする、  
10 請求項 1 記載のスクリーニング方法。

12. 請求項 1 記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩。

13. 請求項 1 記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩を含有してなる、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患  
15 の予防・治療薬。

14. 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードする塩基配列またはその部分配列を含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリー  
20 ニング方法。

15. 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードする塩基配列またはその部分配列を含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリー  
25 ニング方法。

16. ポリヌクレオチドが配列番号:3 または配列番号:4 で表される塩基配

列またはその部分配列を含有する請求項 1 4 記載のスクリーニング方法。

1 7. 疾患が腎疾患である請求項 1 4 記載のスクリーニング方法。

1 8. 腎疾患が E g r - l 依存性腎疾患である請求項 1 7 記載のスクリーニング方法。

5 1 9. 腎疾患が糖尿病性腎症である請求項 1 7 記載のスクリーニング方法。

2 0. 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードする RNA の量を比較することを特徴とする、請求項 1 4 記載のスクリーニング方法。

15 2 1. 請求項 1 4 記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩。

2 2. 請求項 1 4 記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩を含有してなる、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬。

20 2 3. 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩に対する抗体。

2 4. 請求項 2 3 記載の抗体を含有してなる、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬。

25 2 5. 配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその部分配列を有するポリヌクレオチドを含有してなる、配列番号:1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬。



26. 請求項23記載の抗体を含有してなる、配列番号:1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の診断薬。

5 27. 配列番号:1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列またはその部分配列を有するポリヌクレオチドを含有してなる、配列番号:1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の診断薬。

10 28. 配列番号:5または配列番号:6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、配列番号:1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬。

29. 疾患が腎疾患である請求項28記載の予防・治療薬。

30. 腎疾患がEgfr-1依存性腎疾患である請求項29記載の予防・治療薬。

15 31. 腎疾患が糖尿病性腎症である請求項29記載の予防・治療薬。

32. Egfr-1抑制薬を含有してなる糖尿病性腎症の予防・治療薬。

33. Egfr-1抑制薬が腎Egfr-1抑制薬である請求項32記載の予防・治療薬。

20 34. 哺乳動物にEgfr-1抑制薬を投与することを特徴とする、該哺乳動物における糖尿病性腎症の予防または治療方法。

35. Egfr-1抑制薬が腎Egfr-1抑制薬である請求項34記載の方法。

36. 糖尿病性腎症の予防・治療薬を製造するための、Egfr-1抑制薬の使用。

37. Egfr-1抑制薬が腎Egfr-1抑制薬である請求項36記載の使用。

## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Screening Method

<130> 3011WOOP

<150> JP 2002-3769

<151> 2002-01-10

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Partial amino acid sequence of Egr-1 protein which is conserved  
between human, mouse and rat.

<400> 1

Tyr Gln Ser Gln Leu Ile Lys Pro Ser Arg Met Arg Lys Tyr Pro Asn

1 5 10 15

Arg Pro Ser Lys Thr Pro Pro His Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val

	20		25		30
Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His					
	35		40		45
Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met					
	50		55		60
Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His					
65		70		75	80
Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala					
	85		90		95
Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg His Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys					
	100		105		110
Asp Lys Lys Ala Asp Lys Ser Val Val Ala Ser					
	115		120		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 543

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ala Ala Ala Lys Ala Glu Met Gln Leu Met Ser Pro Leu Gln Ile			
1	5	10	15
Ser Asp Pro Phe Gly Ser Phe Pro His Ser Pro Thr Met Asp Asn Tyr			
	20	25	30
Pro Lys Leu Glu Glu Met Met Leu Leu Ser Asn Gly Ala Pro Gln Phe			
	35	40	45
Leu Gly Ala Ala Gly Ala Pro Glu Gly Ser Gly Ser Asn Ser Ser Ser			
	50	55	60
Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ser			

**PCT/JP03/00111**

65						70						75						80
Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Phe	Asn	Pro	Gln	Ala	Asp	Thr	Gly	Glu	Gln	Pro			
					85						90						95	
Tyr	Glu	His	Leu	Thr	Ala	Glu	Ser	Phe	Pro	Asp	Ile	Ser	Leu	Asn	Asn			
					100						105						110	
Glu	Lys	Val	Leu	Val	Glu	Thr	Ser	Tyr	Pro	Ser	Gln	Thr	Thr	Arg	Leu			
					115						120						125	
Pro	Pro	Ile	Thr	Tyr	Thr	Gly	Arg	Phe	Ser	Leu	Glu	Pro	Ala	Pro	Asn			
					130						135						140	
Ser	Gly	Asn	Thr	Leu	Trp	Pro	Glu	Pro	Leu	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly			
					145						150						155	160
Leu	Val	Ser	Met	Thr	Asn	Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Pro	Ser			
					165						170						175	
Pro	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Gln	Ser	Pro	Pro	Leu	Ser	Cys			
					180						185						190	
Ala	Val	Pro	Ser	Asn	Asp	Ser	Ser	Pro	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ala	Pro	Thr			
					195						200						205	
Phe	Pro	Thr	Pro	Asn	Thr	Asp	Ile	Phe	Pro	Glu	Pro	Gln	Ser	Gln	Ala			
					210						215						220	
Phe	Pro	Gly	Ser	Ala	Gly	Thr	Ala	Leu	Gln	Tyr	Pro	Pro	Pro	Ala	Tyr			
					225						230						235	240
Pro	Ala	Ala	Lys	Gly	Gly	Phe	Gln	Val	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Tyr	Leu			
					245						250						255	
Phe	Pro	Gln	Gln	Gln	Gly	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Thr	Pro	Asp	Gln	Lys			
					260						265						270	
Pro	Phe	Gln	Gly	Leu	Glu	Ser	Arg	Thr	Gln	Gln	Pro	Ser	Leu	Thr	Pro			
					275						280						285	
Leu	Ser	Thr	Ile	Lys	Ala	Phe	Ala	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Gln	Asp	Leu			
					290						295						300	

Lys Ala Leu Asn Thr Ser Tyr Gln Ser Gln Leu Ile Lys Pro Ser Arg  
305 310 315 320  
Met Arg Lys Tyr Pro Asn Arg Pro Ser Lys Thr Pro Pro His Glu Arg  
325 330 335  
Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser  
340 345 350  
Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe  
355 360 365  
Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr  
370 375 380  
Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile  
385 390 395 400  
Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg His Thr Lys  
405 410 415  
Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Lys Lys Ala Asp Lys Ser Val Val Ala  
420 425 430  
Ser Ser Ala Thr Ser Ser Leu Ser Ser Tyr Pro Ser Pro Val Ala Thr  
435 440 445  
Ser Tyr Pro Ser Pro Val Thr Thr Ser Tyr Pro Ser Pro Ala Thr Thr  
450 455 460  
Ser Tyr Pro Ser Pro Val Pro Thr Ser Phe Ser Ser Pro Gly Ser Ser  
465 470 475 480  
Thr Tyr Pro Ser Pro Val His Ser Gly Phe Pro Ser Pro Ser Val Ala  
485 490 495  
Thr Thr Tyr Ser Ser Val Pro Pro Ala Phe Pro Ala Gln Val Ser Ser  
500 505 510  
Phe Pro Ser Ser Ala Val Thr Asn Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly Leu  
515 520 525  
Ser Asp Met Thr Ala Thr Phe Ser Pro Arg Thr Ile Glu Ile Cys

530

535

540

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1629

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1629)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

atg gcc gcg gcc aag gcc gag atg cag ctg atg tcc ccg ctg cag atc 48

Met Ala Ala Ala Lys Ala Glu Met Gln Leu Met Ser Pro Leu Gln Ile

1 5 10 15

tct gac ccg ttc gga tcc ttt cct cac tgc ccc acc atg gac aac tac 96

Ser Asp Pro Phe Gly Ser Phe Pro His Ser Pro Thr Met Asp Asn Tyr

20 25 30

cct aag ctg gag gag atg atg ctg ctg agc aac ggg gct ccc cag ttc 144

Pro Lys Leu Glu Glu Met Met Leu Leu Ser Asn Gly Ala Pro Gln Phe

35 40 45

ctc ggc gcc gcc ggg gcc cca gag ggc agc ggc agc aac agc agc agc 192

Leu Gly Ala Ala Gly Ala Pro Glu Gly Ser Gly Ser Asn Ser Ser Ser

50 55 60

agc agc agc ggg ggc ggt gga ggc ggc ggg ggc ggc agc aac agc agc 240

Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ser

65 70 75 80

agc agc agc agc acc ttc aac cct cag gcg gac acg ggc gag cag ccc 288

Ser Ser Ser Ser Thr Phe Asn Pro Gln Ala Asp Thr Gly Glu Gln Pro	
85 90 95	
tac gag cac ctg acc gca gag tct ttt cct gac atc tct ctg aac aac	336
Tyr Glu His Leu Thr Ala Glu Ser Phe Pro Asp Ile Ser Leu Asn Asn	
100 105 110	
gag aag gtg ctg gtg gag acc agt tac ccc agc caa acc act cga ctg	384
Glu Lys Val Leu Val Glu Thr Ser Tyr Pro Ser Gln Thr Thr Arg Leu	
115 120 125	
ccc ccc atc acc tat act ggc cgc ttt tcc ctg gag cct gca ccc aac	432
Pro Pro Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Phe Ser Leu Glu Pro Ala Pro Asn	
130 135 140	
agt ggc aac acc ttg tgg ccc gag ccc ctc ttc agc ttg gtc agt ggc	480
Ser Gly Asn Thr Leu Trp Pro Glu Pro Leu Phe Ser Leu Val Ser Gly	
145 150 155 160	
cta gtg agc atg acc aac cca ccg gcc tcc tcg tcc tca gca cca tct	528
Leu Val Ser Met Thr Asn Pro Pro Ala Ser Ser Ser Ser Ala Pro Ser	
165 170 175	
cca gcg gcc tcc tcc gcc tcc gcc tcc cag agc cca ccc ctg agc tgc	576
Pro Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ala Ser Gln Ser Pro Pro Leu Ser Cys	
180 185 190	
gca gtg cca tcc aac gac agc agt ccc att tac tca gcg gca ccc acc	624
Ala Val Pro Ser Asn Asp Ser Ser Pro Ile Tyr Ser Ala Ala Pro Thr	
195 200 205	
ttc ccc acg ccg aac act gac att ttc cct gag cca caa agc cag gcc	672
Phe Pro Thr Pro Asn Thr Asp Ile Phe Pro Glu Pro Gln Ser Gln Ala	
210 215 220	
ttc ccg ggc tcg gca ggg aca gcg ctc cag tac ccg cct cct gcc tac	720
Phe Pro Gly Ser Ala Gly Thr Ala Leu Gln Tyr Pro Pro Pro Ala Tyr	
225 230 235 240	

cct gcc gcc aag ggt ggc ttc cag gtt ccc atg atc ccc gac tac ctg	768
Pro Ala Ala Lys Gly Gly Phe Gln Val Pro Met Ile Pro Asp Tyr Leu	
245 250 255	
ttt cca cag cag cag ggg gat ctg ggc ctg ggc acc cca gac cag aag	816
Phe Pro Gln Gln Gln Gly Asp Leu Gly Leu Gly Thr Pro Asp Gln Lys	
260 265 270	
ccc ttc cag ggc ctg gag agc cgc acc cag cag cct tcg cta acc cct	864
Pro Phe Gln Gly Leu Glu Ser Arg Thr Gln Gln Pro Ser Leu Thr Pro	
275 280 285	
ctg tct act att aag gcc ttt gcc act cag tcg ggc tcc cag gac ctg	912
Leu Ser Thr Ile Lys Ala Phe Ala Thr Gln Ser Gly Ser Gln Asp Leu	
290 295 300	
aag gcc ctc aat acc agc tac cag tcc cag ctc atc aaa ccc agc cgc	960
Lys Ala Leu Asn Thr Ser Tyr Gln Ser Gln Leu Ile Lys Pro Ser Arg	
305 310 315 320	
atg cgc aag tat ccc aac cgg ccc agc aag acg ccc ccc cac gaa cgc	1008
Met Arg Lys Tyr Pro Asn Arg Pro Ser Lys Thr Pro Pro His Glu Arg	
325 330 335	
cct tac gct tgc cca gtg gag tcc tgt gat cgc cgc ttc tcc cgc tcc	1056
Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser	
340 345 350	
gac gag ctc acc cgc cac atc cgc atc cac aca ggc cag aag ccc ttc	1104
Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe	
355 360 365	
cag tgc cgc atc tgc atg cgc aac ttc agc cgc agc gac cac ctc acc	1152
Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr	
370 375 380	
acc cac atc cgc acc cac aca ggc gaa aag ccc ttc gcc tgc gac atc	1200
Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile	



385	390	395	400	
tgt gga aga aag ttt gcc agg agc gat gaa cgc aag agg cat acc aag	1248			
Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg His Thr Lys				
405	410	415		
atc cac ttg cgg cag aag gac aag aaa gca gac aaa agt gtt gtg gcc	1296			
Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Lys Lys Ala Asp Lys Ser Val Val Ala				
420	425	430		
tct tcg gcc acc tcc tct ctc tct tcc tac ccg tcc ccg gtt gct acc	1344			
Ser Ser Ala Thr Ser Ser Leu Ser Ser Tyr Pro Ser Pro Val Ala Thr				
435	440	445		
tct tac ccg tcc ccg gtt act acc tct tat cca tcc ccg gcc acc acc	1392			
Ser Tyr Pro Ser Pro Val Thr Thr Ser Tyr Pro Ser Pro Ala Thr Thr				
450	455	460		
tca tac cca tcc cct gtg ccc acc tcc ttc tcc tct ccc ggc tcc tcg	1440			
Ser Tyr Pro Ser Pro Val Pro Thr Ser Phe Ser Ser Pro Gly Ser Ser				
465	470	475	480	
acc tac cca tcc cct gtg cac agt ggc ttc ccc tcc ccg tcg gtg gcc	1488			
Thr Tyr Pro Ser Pro Val His Ser Gly Phe Pro Ser Pro Ser Val Ala				
485	490	495		
acc acg tac tcc tct gtt ccc cct gct ttc ccg gcc cag gtc agc agc	1536			
Thr Thr Tyr Ser Ser Val Pro Pro Ala Phe Pro Ala Gln Val Ser Ser				
500	505	510		
ttc cct tcc tca gct gtc acc aac tcc ttc agc gcc tcc aca ggg ctt	1584			
Phe Pro Ser Ser Ala Val Thr Asn Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly Leu				
515	520	525		
tcg gac atg aca gca acc ttt tct ccc agg aca att gaa att tgc	1629			
Ser Asp Met Thr Ala Thr Phe Ser Pro Arg Thr Ile Glu Ile Cys				
530	535	540		

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1629

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1629)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 4

atg gcc gcg gcc aag gcc gag atg cag ctg atg tcc ccg ctg cag atc 48

Met Ala Ala Ala Lys Ala Glu Met Gln Leu Met Ser Pro Leu Gln Ile

1

5

10

15

tct gac ccg ttc gga tcc ttt cct cac tcg ccc acc atg gac aac tac 96

Ser Asp Pro Phe Gly Ser Phe Pro His Ser Pro Thr Met Asp Asn Tyr

20

25

30

cct aag ctg gag gag atg atg ctg ctg agc aac ggg gct ccc cag ttc 144

Pro Lys Leu Glu Glu Met Met Leu Leu Ser Asn Gly Ala Pro Gln Phe

35

40

45

ctc ggc gcc gcc ggg gcc cca gag ggc agc ggc agc aac agc agc agc 192

Leu Gly Ala Ala Gly Ala Pro Glu Gly Ser Gly Ser Asn Ser Ser Ser

50

55

60

agc agc agc ggg ggc ggt gga ggc ggc ggg ggc ggc agc aac agc agc 240

Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ser

65

70

75

80

agc agc agc agc acc ttc aac cct cag gcg gac acg ggc gag cag ccc 288

Ser Ser Ser Ser Thr Phe Asn Pro Gln Ala Asp Thr Gly Glu Gln Pro

85

90

95

tac gag cac ctg acc gca gag tct ttt cct gac atc tct ctg aac aac	336
Tyr Glu His Leu Thr Ala Glu Ser Phe Pro Asp Ile Ser Leu Asn Asn	
100 105 110	
gag aag gtg ctg gtg gag acc agt tac ccc agc caa acc act cga ctg	384
Glu Lys Val Leu Val Glu Thr Ser Tyr Pro Ser Gln Thr Thr Arg Leu	
115 120 125	
ccc ccc atc acc tat act ggc cgc ttt tcc ctg gag cct gca ccc aac	432
Pro Pro Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Phe Ser Leu Glu Pro Ala Pro Asn	
130 135 140	
agt ggc aac acc ttg tgg ccc gag ccc ctc ttc agc ttg gtc agt ggc	480
Ser Gly Asn Thr Leu Trp Pro Glu Pro Leu Phe Ser Leu Val Ser Gly	
145 150 155 160	
cta gtg agc atg acc aac cca ccg gcc tcc tcg tcc tca gca cca tct	528
Leu Val Ser Met Thr Asn Pro Pro Ala Ser Ser Ser Ser Ala Pro Ser	
165 170 175	
cca gcg gcc tcc tcc gcc tcc gcc tcc cag agc cca ccc ctg agc tgc	576
Pro Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ala Ser Gln Ser Pro Pro Leu Ser Cys	
180 185 190	
gca gtg cca tcc aac gac agc agt ccc att tac tca gcg gca ccc acc	624
Ala Val Pro Ser Asn Asp Ser Ser Pro Ile Tyr Ser Ala Ala Pro Thr	
195 200 205	
ttc ccc acg ccg aac act gac att ttc cct gag cca caa agc cag gcc	672
Phe Pro Thr Pro Asn Thr Asp Ile Phe Pro Glu Pro Gln Ser Gln Ala	
210 215 220	
ttc ccg ggc tcg gca ggg aca gcg ctc cag tac ccg cct cct gcc tac	720
Phe Pro Gly Ser Ala Gly Thr Ala Leu Gln Tyr Pro Pro Pro Ala Tyr	
225 230 235 240	
cct gcc gcc aag ggt ggc ttc cag gtt ccc atg atc ccc gac tac ctg	768
Pro Ala Ala Lys Gly Gly Phe Gln Val Pro Met Ile Pro Asp Tyr Leu	

245	250	255	
ttt cca cag cag cag ggg gat ctg ggc ctg ggc acc cca gac cag aag			816
Phe Pro Gln Gln Gln Gly Asp Leu Gly Leu Gly Thr Pro Asp Gln Lys			
260	265	270	
ccc ttc cag ggc ctg gag agc cgc acc cag cag cct tcg cta acc cct			864
Pro Phe Gln Gly Leu Glu Ser Arg Thr Gln Gln Pro Ser Leu Thr Pro			
275	280	285	
ctg tct act att aag gcc ttt gcc act cag tcg ggc tcc cag gac ctg			912
Leu Ser Thr Ile Lys Ala Phe Ala Thr Gln Ser Gly Ser Gln Asp Leu			
290	295	300	
aag gcc ctc aat acc agc tac cag tcc cag ctc atc aaa ccc agc cgc			960
Lys Ala Leu Asn Thr Ser Tyr Gln Ser Gln Leu Ile Lys Pro Ser Arg			
305	310	315	320
atg cgc aag tac ccc aac cgg ccc agc aag acg ccc ccc cac gaa cgc			1008
Met Arg Lys Tyr Pro Asn Arg Pro Ser Lys Thr Pro Pro His Glu Arg			
325	330	335	
cct tac gct tgc cca gtg gag tcc tgt gat cgc cgc ttc tcc cgc tcc			1056
Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser			
340	345	350	
gac gag ctc acc cgc cac atc cgc atc cac aca ggc cag aag ccc ttc			1104
Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe			
355	360	365	
cag tgc cgc atc tgc atg cgc aac ttc agc cgc agc gac cac ctc acc			1152
Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr			
370	375	380	
acc cac atc cgc acc cac aca ggc gaa aag ccc ttc gcc tgc gac atc			1200
Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile			
385	390	395	400
tgt gga aga aag ttt gcc agg agc gat gaa cgc aag agg cat acc aag			1248

12/15

Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg His Thr Lys	
405 410 415	
atc cac ttg cgg cag aag gac aag aaa gca gac aaa agt gtt gtg gcc	1296
Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Lys Lys Ala Asp Lys Ser Val Val Ala	
420 425 430	
tct tcg gcc acc tcc tct ctc tct tcc tac ccg tcc ccg gtt gct acc	1344
Ser Ser Ala Thr Ser Ser Leu Ser Ser Tyr Pro Ser Pro Val Ala Thr	
435 440 445	
tct tac ccg tcc ccg gtt act acc tct tat cca tcc ccg gcc acc acc	1392
Ser Tyr Pro Ser Pro Val Thr Thr Ser Tyr Pro Ser Pro Ala Thr Thr	
450 455 460	
tca tac cca tcc cct gtg ccc acc tcc ttc tcc tct ccc ggc tcc tcg	1440
Ser Tyr Pro Ser Pro Val Pro Thr Ser Phe Ser Ser Pro Gly Ser Ser	
465 470 475 480	
acc tac cca tcc cct gtg cac agt ggc ttc ccc tcc ccg tcg gtg gcc	1488
Thr Tyr Pro Ser Pro Val His Ser Gly Phe Pro Ser Pro Ser Val Ala	
485 490 495	
acc acg tac tcc tct gtt ccc cct gct ttc ccg gcc cag gtc agc agc	1536
Thr Thr Tyr Ser Ser Val Pro Pro Ala Phe Pro Ala Gln Val Ser Ser	
500 505 510	
ttc cct tcc tca gct gtc acc aac tcc ttc agc gcc tcc aca ggg ctt	1584
Phe Pro Ser Ser Ala Val Thr Asn Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly Leu	
515 520 525	
tcg gac atg aca gca acc ttt tct ccc agg aca att gaa att tgc	1629
Ser Asp Met Thr Ala Thr Phe Ser Pro Arg Thr Ile Glu Ile Cys	
530 535 540	

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 9

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as decoy for Egr-1.

<400> 5

gcgtgggcg

9

<210> 6

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as decoy for Egr-1.

<400> 6

gcgggggcg

9

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as antisense DNA for Egr-1 mRNA.

<400> 7

gcggggtgca ggggcacact

20

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying Egr-1  
cDNA.

<400> 8

ccgaattcag tgttccccgc gccccgcatg

30

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying Egr-1  
cDNA.

<400> 9

ggctcgagaa cctccatcig acctaagag

29

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as sense strand of double-stranded  
DNA capable of binding with Egr-1.

<400> 10

tgactcgccc tcgccccgc gccggg

26

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as sense strand of double-stranded  
DNA incapable of binding with Egr-1.

<400> 11

tgactcgccc tcgaccagc gccggg

26



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00111

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/50, 33/15, C07K16/18, A61K45/00, 48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/50, 33/15, C07K16/18, A61K45/00, 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/62561 A (GLAXO GROUP LTD.), 09 December, 1999 (09.12.99), & JP 2002-516676 A	14, 15
X	JP 2000-506725 A (Unisearch Ltd.), 06 June, 2000 (06.06.00), & WO 97/32979 A	25
X	US 6008048 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC.), 28 December, 1999 (28.12.99), & EP 1135402 A	25
X	BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, Vol.32, No.1, (1994), pages 39 to 47	23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 April, 2003 (14.04.03)

Date of mailing of the international search report  
30 April, 2003 (30.04.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00111

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 89/09777 A (ARCH DEVELOPMENT CORP.), 19 October, 1989 (19.10.89), & US 5206152 A	1-11, 14-20, 23-33, 35-37
A	WO 94/23030 A (ARCH DEVELOPMENT CORP.), 13 October, 1994 (13.10.94), & US 5206152 A	1-11, 14-20, 23-33, 35-37
A	WO 01/04356 A (GENE LOGIC INC.), 18 January, 2001 (18.01.01), & AU 6088300 A	1-11, 14-20, 23-33, 35-37
A	WO 01/74298 A (BROWN UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION), 11 October, 2001 (11.10.01), & AU 512401 A	1-11, 14-20, 23-33, 35-37

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00111

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 34

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

It pertains to therapeutic methods.

2. ☒ Claims Nos.: 12, 13, 21, 22

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

It is unclear what substances are involved in the scope of the compounds obtained by the screening method and remedies/preventives containing the compounds are also unclear.

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/50、33/15、C07K16/18、A61K45/00、48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/50、33/15、C07K16/18、A61K45/00、48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 99/62561 A (GLAXO GROUP LIMIGTED) 1999. 12. 09 & JP 2002-516676 A	14, 15
X	JP 2000-506725 A (ユニサーチ リミテッド) 2000. 06. 06 & WO 97/32979 A	25
X	US 6008048 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC.) 1999. 12. 28 & EP 1135402 A	25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 04. 03

国際調査報告の発送日

30.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

2J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL VOL. 32, NO. 1, (1994), p. 39-47	23
A	WO 89/09777 A (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 1989. 10. 19 & US 5206152 A	1-11, 14-20, 23-33, 35-37
A	WO 94/23030 A (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 1994. 10. 13 & US 5206152 A	1-11, 14-20, 23-33, 35-37
A	WO 01/04356 A (GENE LOGIC INC.) 2001. 01. 18 & AU 6088300 A	1-11, 14-20, 23-33, 35-37
A	WO 01/74298 A (BROWN UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 2001. 10. 11 & AU 512401 A	1-11, 14-20, 23-33, 35-37

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 34 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
治療方法である
2. ☒ 請求の範囲 12, 13, 21, 22 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
スクリーニング方法によって得られた化合物には如何なる物質が含まれるのか不明確であり、その化合物を含有する予防・治療薬も同様に不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。